

배양 조건이 *Bacillus thuringiensis* 독소단백질의 생산에 미치는 영향김태완 · 김태환 · 유용만^{1*}우진비엔비(주) 중앙연구소, ¹충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과Effect on the Production of Toxin Protein of *Bacillus thuringiensis* by Culture ConditionsTae Wan Kim, Tae Hwan Kim and Yong Man Yu^{1*}

Central Research Institute, WooGene B&G CO., LTD, #528-5,

Songasn-Ri, Yanggam-Myeon, Hwaseong-Si, Gyeonggi-Do, Korea 445-930

¹Department of Applied Biology, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea,

(Received on November 7, 2014. Revised on November 10, 2014. Accepted on November 23, 2014)

Abstract We was investigated parasporal inclusion proteins change to use industrial medium of new strain *Bacillus thuringiensis* CAB 565, CAB 566. To confirm medium's oxygen efficient consist of glucose and yeast extract, we was conducted oxygen transfer coefficients (KLa) of medium's concentration and impeller in 20 l-Jar fermentor. When to increase air flow rate and medium concentration, KLa rate is rise. Also it is effective on agitation rate 200 rpm, but KLa rate is decrease when to rise agitation rate. To hold dissolved oxygen rate (upper 50%), Air flow rate is steadily increase on culture to use microsparger. When 16 hour of culture stage, *B.t.* CAB 565 and *B.t.* CAB 566 harvested respectively 2.3×10^{10} , 1.8×10^{10} viable cell/ml. When 54 hour, *B.t.* CAB565, 566 harvested respectively 1.9×10^{10} , 1.4×10^{10} spore/ml. To resulting carbon's concentration, It is the most effective that glucose concentration is contained 5% in medium.

Key words *Bacillus thuringiensis*, parasporal inclusion protein, dissolved oxygen, oxygen transfer coefficient

서론

전 세계적으로 농작물의 해충방제를 위하여 *Bacillus thuringiensis*를 이용한 미생물 살충제제가 광범위하게 이용되고 [Andrews et al., 1987] 있으며 국내외적으로 사용량이 증가하고 있다. *B. thuringiensis*의 살충성 활성물질은 포자형성 동안에 생성되는 결정체 독소 단백질인 δ -endotoxin으로 알려져 있다[Krieg and Miltenburger, 1984; Aronson et al., 1986]. 이 결정체 독소 단백질의 생성량이 *B. thuringiensis* 제제의 살충 성능을 좌우하고[Morris et al., 1996], 이는 균주에 따라 달라질 수 있지만, 배지의 조성과 배양 조건에 따라 포자의 형성, 결정체 독소 단백질인 δ -endotoxin의 생성을 조

절 할 수 있다고 보고되었다[Holmberg et al., 1980]. 따라서 우수한 살충력을 가진 *B. thuringiensis* 균주의 영양분 요구 특성을 구명하고 최적의 발효 배지 및 배양 조건을 확립하는 것이 중요하다. 하지만, 일반적으로 고효율 균주는 배양 실험을 통해 선별되는데, 주로 진탕 배양기를 사용하여 배양 실험이 수행되며, 추가 적인 배양 실험에 많은 시간과 노력이 필요하다. 대량생산의 최적화를 위하여 발효 배지 및 배양 조건을 맞추기 위한 플라켓-버만 설계법(Plackett-Burman design method)이나 반응표면분석법(Response surface method, RSM) 등과 같은 통계학적 방법들이 이용되고 있다. 그러나 통계학적 방법을 사용하더라도 미생물 배지 및 배양 조건 최적화 단계까지 실험을 하기 위해서는 많은 횟수의 실험이 필요하다. 특히, *B. thuringiensis*는 C/N ratio, 무기염의 첨가 정도, 배양액 내 산소전달 계수(KLa)의 특성에 따라 포자의 형성과 δ -endotoxin의 생성량의 변화가 큰

*Corresponding author

Tel: +82-42-821-5763, Fax: +82-42-823-8679

E-mail: ymyu@cnu.ac.kr

것으로 알려져 있어 면밀한 검토가 필요하다. 이에 본 연구에서는 소형 생물반응기를 통해 새롭게 선발된 높은 살충력을 만들어내는 두 종류의 *B. thuringiensis* 균주를 활용하여 여러 가지 배양 조건인 배지성분, 용존산소, pH, 세포농도, 포자농도 그리고 δ -endotoxin의 변화를 모니터링하면서 발효 배지와 배양조건의 최적화 연구를 검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에 사용된 *Bacillus thuringiensis*(이하 B.t.) CAB565, CAB566는 충남대학교 응용생물학과 생물적해충제어 실험실에서 분리한 균주를 분양 받아 사용하였다. 두 균주는 결정체 독소 단백질을 생산하는 염기서열을 분석한 결과 *B.t.* CAB565과 CAB566균주는 각각 혈청형이 *B.t.* subsp. *kurstaki*와 *B.t.* subsp. *aizawai*로 동정되었다. 보존 균주는 glycerol (50%)를 이용하여 -80°C 에서 저장하였고, Nutrient Agar (Difco)배지에 계대 배양하여 실험에 사용하였다. 접종용 균주의 배양은 250 ml의 삼각플라스크에 Nutrient Broth 배양 배지를 50 ml 첨가하여 121°C 20분 멸균한 후 0.5% 균을 접종하여 30°C 에서 8시간 동안 120 rpm에서 진탕 배양하여 사용하였다.

배양용 배지 조성

산업용 배양용 배지의 성분은 Yeast extract 0.8%, CSL 3%, SBM 2%, Ammonium sulfate 0.05%, Calcium chloride $2\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, Magnesium sulfate $7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, Maganse sulfate $5\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, Sodium hydrogen phosphate, DiO.15%, Antifoam(Konion) 0.5%로 조제하고 Glucose는 각 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% 그리고 10%를 첨가하여 증류수에 용해하고 이때 pH는 4NKOH (NaOH)를 이용하고 pH 7.0으로 조절하여 Working volume이 30 l로 만들어서 120°C 에서 15분 멸균하여 배양하여 사용하였다.

반응기 제작 및 DO 측정 시스템

본 실험에 사용된 반응기는 외경이 36.9 cm, 내경 30.9 cm, 높이 67.4 cm인 Steel Use Stainless(SUS 316 l)로 된 원통형 50 l 형태로 (주)퍼멘텍에서 제작하였다. 내경에 장착할 임펠러로는 6개의 날개가 있는 터빈형(Turbine Impeller)과 패들형(Paddle Impeller)을 이용하였다. 터빈임펠러와 패들임펠러의 경우 지름이 15.5 cm이고 높이가 10 cm로 반응기 내경의 50.1%이었으며, 하층 임펠러와 바닥 사이의 거리는 15 cm로 하였다. 통기 장치는 Microsparger (Mott corporation)로 통기 구멍 크기가 $24\ \mu\text{m}$ 로 직경은 외경 2 mm, 내경 1.5 mm, 길이 10 cm를 사용하였다. 제작된 배양기에 Do Probe (Broadley James: USA)를 부착하고, Probe로부터

출력되는 신호의 데이터는 컴퓨터를 이용하여 1분 단위로 자동적으로 저장되도록 하였다. 컴퓨터에 전달된 전압 값은 계산식에 의해 용존 산소농도(%)로 환산되어 화면상에 표시되었다. 산소전달계수(K_{La})를 구하기 위해, 일반적으로 많이 쓰이고 있는 Dynamic method를 이용하였다.

Glucose 농도에 따른 배양

Glucose 첨가의 영향에 대한 실험은 기존 배지에 glucose 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% 그리고 10% 등 9종류로 첨가하여 영양세포와 포자 형성 그리고 독소 단백질에 대한 영향을 검토하였다. 배양 중 pH는 2 N HCl과 2 N KOH를 이용하여 pH 7.0으로 조절하였으며, 배양중에 발생하는 과량의 foam은 Antifoam LS-303(한국다우코닝)을 3배 희석하여 멸균전 30 ml 첨가하였다. 50 l 발효기에 working volume을 30 l로 하고 120°C 에서 15분 동안 혼합 멸균한 후 0.5% 균을 접종하고 30°C 에서 1.0 vvm 통기량과 rpm 200의 교반 속도에서 배양하였다.

반응기에서의 Microsparger 적용에 따른 B.t. CAB565와 CAB566균주의 배양

B.t. CAB565와 CAB566균주의 배양에서 마이크로 버블의 산소전달에 의한 영양세포와 포자형성 및 δ -endotoxin의 수율을 조사하기 위해 (주)퍼멘텍에서 제작된 50 l 반응기를 사용하였다. 이때 microsparger (size: $24\ \mu\text{l}$)를 부착하였다. 배양액에 산소를 공급하기 위해 공기를 Vessel 바닥에 부착된 microsparger를 통해 주입하였다. 교반 속도는 200RPM으로 하였으며 통기 속도를 조절하여 배양 2일(48시간) 후 수율을 확인하였다.

B.t. CAB565와 CAB566 균주의 산소요구도 측정

B.t. CAB565와 CAB566균주의 산소 요구도의 측정은 50 l 반응기를 사용하였으며, glucose 함량이 각 다른 배지를 측정하여 working volume 30 l로 하여 120°C 에서 15분 멸균하였다. 이후 냉각하여 배양온도인 30°C 에서 100 rpm로 연속 교반하면서 공기를 유입하여 용존산소를 100%로 유지한 후 *B.t.* CAB565, CAB566균주를 각각 0.5% 접종한 후 공기를 중단하여 Oxygen uptake rate (OUR) 값을 측정하였다. 또한 교반 속도를 150, 200, 250 그리고 300 rpm 등 4단계로 변환시킨 후 산소 요구도를 측정하였다.

분석방법

생존세포(영양세포: viable cell은 희석한 시료)를 열처리 없이 NA 배지에 접종하여 colony수를 측정하는 것을 cfu (crystal formation unit)/ml로 나타내었고, spore 수는 희석한 시료를 80°C 의 Water bath에서 15분간 열처리한 후 NA 배지에 접종하여 colony수를 측정하였다. δ -endotoxin량을

정량적으로 측정하기 위해 Bradford method 법을 사용하였고 [Bradford, 1976], 시료의 전처리하는 기준에 알려진 방법을 참고하여 실험하였다[Khedher et al., 2014]. δ -endotoxin을 정량적으로 측정하기 위해 Bovine serume albumine을 최종농도가 0-100 $\mu\text{g/ml}$ 로 샘플을 제조하여 단백질을 측정하고, 이 결과는 *B.t.* CAB565와 CAB566 균주의 배양 완료액의 δ -endotoxin의 함량 측정하는데 Standard curve로 사용하였다.

결과 및 고찰

Microsparger와 임펠러 형태가 산소 전달 속도에 미치는 영향

통기시 산소 전달 속도는 주로 교반 속도, 통기속도, 기체가 단위 부피당 액체와 맞닿아 있는 표면적에 비례한다. 제작된 반응기에서 물을 매질로 사용하여 통기하였을 때 산소 전달계수(KLa) 값은 5-20 hr^{-1} 정도였고 배지를 매질로 사용하여 통기하였을 때는 5-50 hr^{-1} 정도로 배지를 매질로 사용하였을 때가 훨씬 높았다. 통기시에 공기 방울이 microsparger에서 나와서 액의 표면까지 이동할 때 공기 방울끼리 서로 응집되는 현상이 나타났다. 응집이 일어나면 공기 방울의 크기가 커져 산소 전달속도는 감소하게 된다. 매질로 배지를 이용했을 때는 배지내의 성분들 및 특정 배지의 농도로 인해 공기 방울의 표면이 포화되어 공기 방울이 서로 뭉치는 현상이 적어지므로 산소 전달이 증가했을 것으로 보인다. 배지 농도에 따른 Microsparger를 사용하여 KLa 값을 측정하여 본 결과, 배지 농도가 높을수록 KLa 값이 더 커졌다. 이는 배지 농도가 높아질수록 공기 방울이 배지로 인해 표면적이 커졌고, 응집 현상이 적게 나타난 것으로 보인다 (Fig. 1).

대부분의 결과에서 교반 속도와 통기 속도가 증가함에 따라 KLa 값이 거의 일정하게 증가하는 것이 관찰되었다. 그러나 배지를 매질로 한 경우 교반 속도가 증가함에 따라 KLa 값이 일정하게 증가하는 경향이 보이지 않았으며, 높은 통기 속도로 통기 하였을 때, 200 rpm 이상의 교반 속도에서는 교반 속도가 낮을 때가 높을 때보다 KLa 값이 더 높았다(Fig. 2).

이런 현상은 교반시 와류 발생으로 인해 공기방울이 임펠러의 회전축으로 모이는 것으로 인해 공기 방울의 응집 현상이 일어나고 이는 교반 속도를 높일수록 더 심하였다. 매우 작은 공기 방울이 생성될 때 이런 응집 현상은 KLa 값의 심한 감소를 초래한다. Microsparger의 경우, 매우 작은 공기 방울이 생성되므로 교반 속도를 높일 때 교반에 의한 산소 전달의 증가보다 위의 응집현상에 의한 산소 전달의 감소가 더 크게 영향을 미치는 것으로 보인다. 터빈 임펠러를 사용했을 때와 패들형 날개를 가진 임펠러를 사용 했을 때의 KLa 값을 비교해 보면, 패들형 보다 터빈형 임펠러를 사

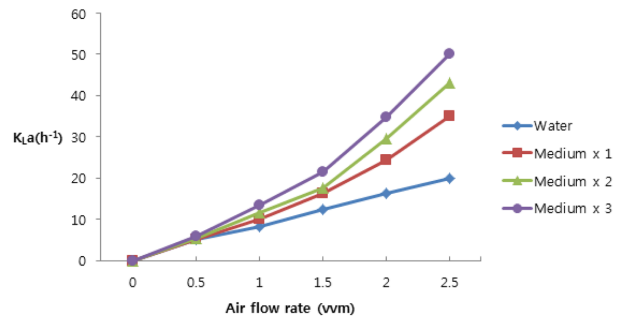


Fig. 1. Effect of aeration rates on KLa in medium density and water.

Pore size of sparger : 24 μm

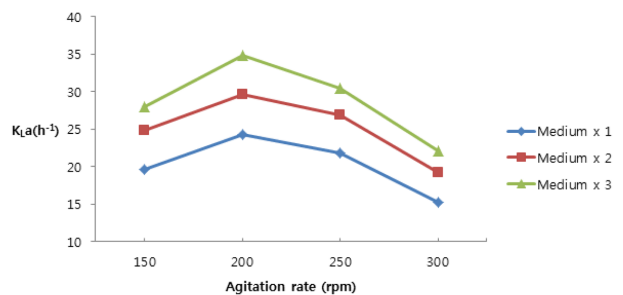


Fig. 2. KLa trends in the medium according to the agitation rate effects.

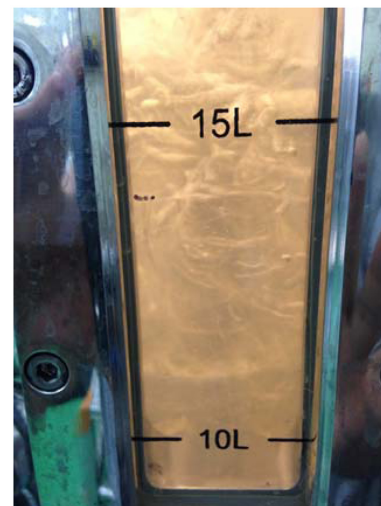


Fig. 3. Aggregation trends according to the air bubbles in the impeller type : Turbine impeller, Paddle impeller.

용했을 때가 KLa 값이 다소 높았다. 교반시 공기 방울이 회전축으로 모이는 정도가, 터빈형 임펠러를 사용하였을 때가 패들형 날개를 가진 임펠러를 사용할 때보다 덜 하였다. 이 루 미루어, 터빈형 임펠러를 사용하는 것이 산소 전달에는 더 유리 할 것으로 판단된다(Fig. 3).

Microsparger를 이용한 통기하에서의 세포 성장 영향

세포의 성장과 포자 및 독소단백질의 형성에 대한 용존산

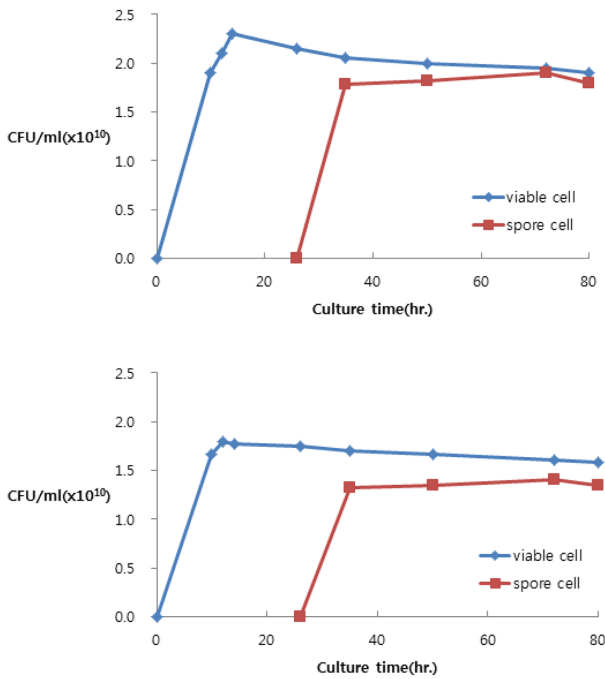


Fig. 4. Profiles of viable cell and spore number during a batch culture of *B. thuringiensis* under dissolved oxygen concentration of 50% saturation (A) *B. thuringiensis* CAB565, (B) *B. thuringiensis* CAB566.

소량의 영향을 검토하기 위해 Microsparger를 반응기에 장치하여 배양 초기부터 30 l/min(약 1 vvm)의 일정한 속도로 계속 통기했을 때는 세포가 정상적으로 성장하지 못하였다. 이것은 배양 초기 세포가 불안정하고 세포의 양도 적은 상태이므로, 통기에 의한 세포 손상도 나타나기 때문으로 보인다. *B.t.* CAB565균주는 용존 산소가 50% 조절 통기를 유지 하여 배양한 결과, Fig. 4와 같이 최대의 영양세포는 14시간 배양에서 2.3×10^{10} cell/ml를 얻었으며 포자수는 72시간 1.9×10^{10} spore/ml로서 최대값을 보였다. *B.t.* CAB566 균주 또한 Fig. 4와 같이 최대의 영양세포는 12시간 배양에서 1.8×10^{10} cell/ml를 얻었으며 포자수는 72시간 1.4×10^{10} spore/ml로서 최대값을 보였다.

배양 초기, 즉 균주 접종 후 4시간 동안 15 l/min(약 0.5 vvm) 일정하게 통기하여 용존 산소 농도가 50% 이하로 떨어지지 않았으며, 그 후 50% 이하로 떨어질 때마다 3 l/ml (약 0.1 vvm)의 속도로 단계적으로 통기 속도를 높여 배양하였다(Fig. 5). 산소 소모량은 배양 8시간부터 급격히 소모하기 시작하여 16시간 최대를 보이다가 이후 완만하게 감소하는 경향을 보여, 산소 소모량과 세포 성장 패턴이 동일한 경향을 보였다. 한편 포자수는 배양 20시간 후부터 증가하기 시작하여 54시간 까지 급격하게 증가하다가 배양 72시간에 최대 포자수를 형성하였다. 하지만 *B.t.* CAB566 균주는 용존 산소 40% (9 l/min) 농도에서 *B.t.* CAB565 균주와 비슷한 세포 성장속도와 포자 형성율을 보이 것으로 보아

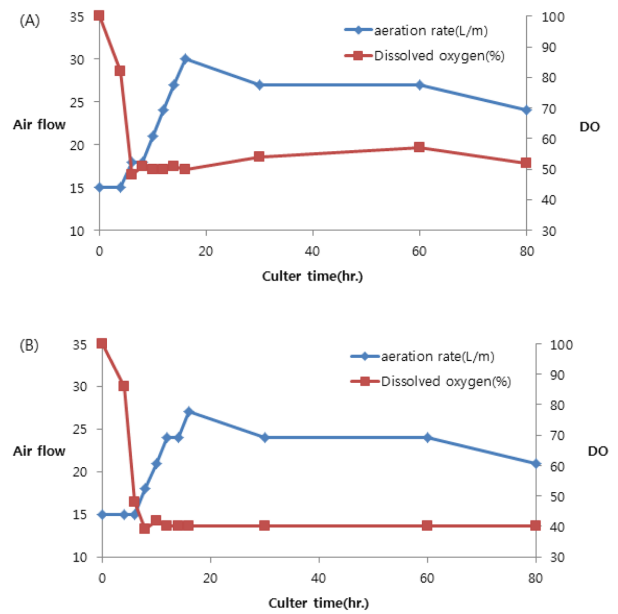


Fig. 5. Air flow and DO trend during culture of *B. thuringiensis*. Culture condition is total volume 30 l, agitation rate 200 rpm, aeration rate 1 vvm, 30°C. (a) *B. thuringiensis* CAB565, (b) *B. thuringiensis* CAB566.

Table 1. The culture conditions, the oxygen transfer coefficient (KLa) and spore formation and d-endotoxin related

Fermentation kinetic parameters	CAB565	CAB566
Vegitative cell ($\times 10^{10}$ cfu/ml)	2.3	1.8
spore cell ($\times 10^{10}$ cfu/ml)	1.9	1.4
sporulation ratio (%)	82.6	77.8
K_{La} (hr^{-1})	280	230 - 250

B.t. CAB566 균주는 비교적 *B.t.* CAB565 균주 보다 용존 산소 요구도가 낮은 것으로 보인다. 이러한 결과들로 보면, *B.t.* CAB565, CAB566 균주들은 영양세포의 성장 과정보다 포자를 형성하는 단계에서 균주에 따른 차이를 보이지만 더 높은 용존 산소량을 요구하는 특성을 가지는 것을 확인하였다(Fig. 5).

또한, 포자의 형성량 및 δ -endotoxin 형성과 산소 전달계수(KLa) 값과의 관계에서 *B.t.* CAB565 균주의 KLa 값은 $280 hr^{-1}$ 정도였으며, *B.t.* CAB566 균주의 KLa 값은 $230-250 hr^{-1}$ 정도로 증가 시킬 때 증가 되었다(Table 1).

산업 배지 Glucose 첨가에 따른 영향

*B.t.*의 포자와 독소단백질의 형성은 탄소원이 고갈되는 시기에 이루어지며[Mummigatti et al., 1990] 질소원과 탄소원의 비율에 의해서도 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있다 [Farrera et al., 1998] 따라서, C/N ratio의 조절, 무기염의 첨가 등에 의한 포자 형성의 영향 등을 연구함으로써 배양 배지를 최적화하는 연구 결과들이 많이 보고되었다[Icgen et

Table 2. Experimental design of standard curve

Sample	S. 1	S. 2	S. 3	S. 4	S. 5	S. 6
BSA (μg)	0	10	20	30	40	50
DW (μl)	500	490	480	470	460	450
concentration (μg/ml)	0	20	40	60	80	100
O.D. (595 nm)	0	0.041	0.097	0.134	0.2	0.244

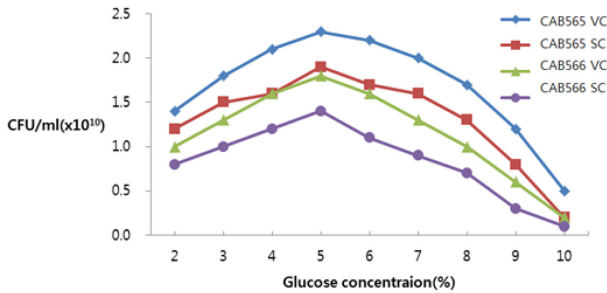


Fig. 6. Evaluation of the glucose effect on cell of *B. thuringiensis* CAB565, CAB566. VC : vegetative cell, SC : Spore cell.

al., 2002a; Icen et al., 2002b]. Glucose를 산업 배지에 비율(2-10%)별로 추가 첨가하여 검정한 결과 영양세포 및 포자수는(가) 낮은 첨가비율에서는 점차 증가하는 경향을 보이다가 6% 이상의 glucose 에서는 오히려 감소하는 경향을 보였다(Fig. 6).

이러한 결과는 초기의 높은 glucose 농도가 세포 성장과 포자에 있어 오히려 저해요소로 작용한다는 연구 결과와 일치하는 것으로 glucose 사용에 있어 5% glucose를 조성으로 하는 산업용 배지 조성이 효과적으로 보인다[Hofte and Whiteley, 1989]. 또한, *B.t.* CAB565, CAB566균주 모두 동일한 결과가 관찰되었다.

산업배지 배양액의 내독소단백질량 측정

배양액내의 내독소단백질은 대상해충의 살충성에 영향을 미치며, 포장형성과 내독소단백질 생성은 서로 연관이 있기 때문에 포자와 생균수의 생성량을 높은 산업배지의 내독소단백질량을 측정하였다(Benoit et al., 1990). 단백질량을 정량하기 위해 Bovine serume albumine을 이용하여 standard curve를 측정하였다(Table 2, Fig. 7). 이를 토대로 *B.t.* CAB 565, CAB566균주의 산업배지 배양액을 희석하여 내독소단백질의 양을 측정하였다(Table 3). 두 균주 중 포장형성이 많았던 *B.t.* CAB565균주의 내독소단백질량이 많은 것으로 확인되었다. 두 균주 배양액의 내독소단백질량을 비교하기 위해 시중에 판매중인 *B.t.* 제(A사)와 생균수 농도를 맞춘 상태에서 측정한 결과 *B.t.* CAB565, CAB566의 내독소단백질량이 더 높은 것으로 확인되었다(Table 4).

본 실험을 바탕으로 *B.t.* CAB565, 566의 나비목해충에 대한 살충력을 높이기 위해 제형화 실험을 진행 중에 있다.

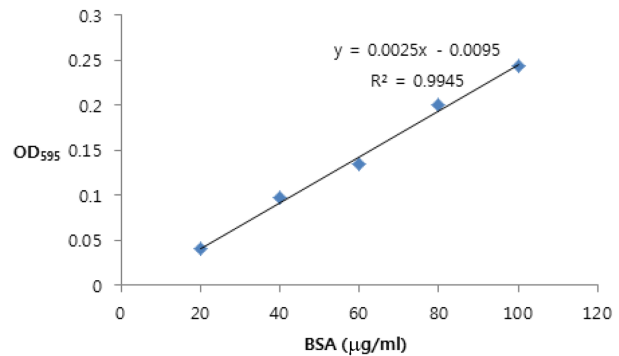


Fig. 7. Standard curve for BSA.

Table 3. Parasporal protein measurement of *B.t.* CAB565, CAB566

<i>B.t.</i> strain	<i>B.t.</i> CAB565	<i>B.t.</i> CAB566
Parasporal protein (μg/ml)	22,230	18,280

Table 4. Parasporal protein measurement of *B.t.* CAB565, CAB566, commercial product (A). Cell count is similarly adjusted 3.0 × 10⁹ cfu/ml

<i>B.t.</i> strain	<i>B.t.</i> CAB565	<i>B.t.</i> CAB566	A product
Parasporal protein (μg/ml)	3,220	3,050	2,560

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원에 의해 “곤충병원 세균을 이용한 나방류 방제”(과제번호; PJ010029)으로 이에 감사를 드립니다.

Literature Cited

Andrews, E. E. Jr., R. M. Faust, H. Wabiko and K. C. Raymond (1987) The biology of *Bacillus thuringiensis*. CRC Crit. Rev. Biotechnol. 6(2):163-232.
 Aronson, A. I., W. Beckman and P. Dumn (1986) *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens, Microbial, Rev. 50:1.
 Benoit, T. G., G. R. Wilson and C. L. Baugh (1990) Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. Lett. Appl. Microbiol. 10:15-18.

- Bradford M. M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical biochemistry*. 72(1):248-254.
- Farrera R. R., F., Perez-guevara, de la Torre (1998) Carbon : nitrogen ratio interacts with initial noncentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73. *Appl Microbiol Biotechnol* 49:758-765.
- Hofte, H. and H. R. Whiteley (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53:242-255.
- Holmberg, A., R. Sievamen and G Carlberg (1980) Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for exotoxin production : Process analysis study. *Biotechnol. Bioeng.* 22:1707-1724.
- Icgen Y., B. Icgen and G. Ozcengiz (2002) Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis* : 1. Effects of mineral elements and pH. *Research in Microbiology* 153:599-604.
- Icgen Y., B. Icgen and G. Ozcengiz (2002) Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis* : 2. Effects of carbon and nitrogen sources. *Research in Microbiology* 153:605-609.
- Khedher S. B., S. Jaoua and N. Zouari (2014) Overcome of carbon catabolite repression of bioinsecticides production by sporeless *Bacillus thuringiensis* through adequate fermentation technology. *Biotechnology Research International*. 2014:8-15.
- Krieg, A. and H. G. Miltenburger (1984) Bioinsecticides. 1. *Bacillus thuringiensis*. *Adv. Biotechnol. Process* 3:273.
- Morris. O. N., V. Converse, P. Kanagaratnam and J. S. Dacies (1996) Effect on cultural conditions on spore-crystal yield and toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*(HD-133). *J. Invertebr. Pathol.* 67:129-136.
- Mummigatti, S. G and A. N. Raghunathan (1990) Influence of media composition on the production of d - endotoxin by *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 55: 147-151.

배양 조건이 *Bacillus thuringiensis* 독소단백질의 생산에 미치는 영향

김태완 · 김태환 · 유용만^{1*}

우진비엔비㈜ 중앙연구소, ¹충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

요 약 신규 병원성세균 *Bacillus thuringiensis* CAB565, 566균주를 이용한 산업배지에서의 배양조건에 따른 독소 단백질의 차이를 확인하였다. 포도당, 효모추출물 등으로 구성된 산업배지의 산소 전달 속도를 확인하고자 소형배양 기에서 임펠러와 배지 농도에 따른 산소전달계수(KLa)의 차이를 확인하였다. 교반기의 통기량이 많을수록 그리고 배 지 농도가 높아질수록 산소전달계수(KLa) 값이 상승하였다. 하지만 교반속도는 200 rpm에서 가장 효율적이었고, 교 반속도가 상승할수록 효과가 떨어졌다. Microsparger를 이용하여 배양 중 단계적으로 통기속도를 높여 배지내 용존 산소농도를 50% 이상으로 유지시켜 배양한 결과 생균수는 배양 후 16시간, 포자수는 54시간에 최대의 농도값을 보 였다. 그 결과, *B.t.* CAB565의 생균수는 2.3×10^{10} cell/ml, 포자수는 1.9×10^{10} spore/ml 그리고 *B.t.* CAB566의 생균 수는 1.8×10^{10} cell/ml, 포자수는 1.4×10^{10} spore/ml를 보였다. 탄소원의 농도는 포도당의 농도가 5%일 때, 세포성 장에 가장 유리한 것으로 조사되었다.

색인어 *Bacillus thuringiensis*, 독소단백질, 용존산소량, 산소전달계수